

Organisation nucléaire et expression des gènes des protéines du lait

par Eric Chanat, Etienne Aujean, Adrian Balteanu, Sophie Chat, Nicolas Coant, Marie-Louise Fontaine, Cathy Hue-Beauvais, Christine Péchoux, Mohammad Bagher Montazer Torbati, Alain Pauloin, Marie Petitbarat & Eve Devinoy

Unité Génomique et Physiologie de la Lactation, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Correspondance : eric.chanat@jouy.inra.fr ou eve.devinoy@jouy.inra.fr

Reçu le 10 avril 2006

RÉSUMÉ

L'expression des gènes codant les protéines du lait varie au cours de la gestation/lactation. Elle est notamment régulée par les hormones lactogènes qui induisent une activation de nombreux facteurs de transcription. Outre l'activité de ces facteurs, modulant leurs capacités de liaison à leurs séquences cibles, l'interaction de ces facteurs avec l'ADN est régie par des variations de la structure chromatiniennne. Dans le noyau des cellules épithéliales mammaires, l'organisation tridimensionnelle des boucles de chromatine, structures limitées par des régions d'attachement à la matrice nucléaire, est en cours d'analyse.

Les principaux composants du lait sont organisés en structures supramoléculaires. Les globules gras sont constitués d'un noyau de triglycérides enveloppé par une membrane tripartite dérivant de différents compartiments cellulaires. Les caséines, protéines majoritaires du lait, forment un agrégat: la micelle de caséines. Leur agrégation progressive dans la voie de sécrétion débute dès le réticulum endoplasmique. Les mésostructures du globule gras et de la micelle restent à préciser. Notre objectif est de progresser dans la connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires qui président à l'élaboration de ces produits du lait.

SUMMARY Nuclear organization and expression of milk protein genes

Milk protein gene expression varies during the pregnancy/lactation cycle under the influence of lactogenic hormones which induce the activation of several transcription factors. Beyond this activation modifying the binding properties of these factors to their consensus sequences, their interactions with DNA is regulated by variations of the chromatin structure. In the nuclei of the mammary epithelial cell, the three dimensional organisation of the chromatin loops, located between matrix attachment regions, is now being studied.

The main milk components are organised in supra-molecular structures. Milk fat globules are made of a

triglyceride core enwrapped by a tripartite membrane originating from various intracellular compartments. The caseins, the main milk proteins, form aggregates: the casein micelles. Their gradual aggregation in the secretory pathway is initiated as soon as from the endoplasmic reticulum. The mesostructures of the milk fat globule and of the casein micelle remain to be elucidated. Our goal is to make some progress into the understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the formation of these milk products.

INTRODUCTION

Le lait, caractéristique des mammifères, est un fluide de composition extrêmement variable. Sa concentration protéique varie, selon les espèces, de 10 g/l chez la femme à plus de 135 g/l chez la lapine (Jenness, 1970). Elle varie de plus au cours de la lactation (Nicholas & Hartmann, 1991). Pendant les premiers jours de la lactation, le colostrum sécrété est très riche en protéines, puis la concentration protéique chute rapidement pour atteindre

un niveau stable qui augmentera de nouveau en fin de lactation (Davies *et al.*, 1983).

La nature des protéines qui composent le lait est également extrêmement variable selon les espèces (Jenness, 1970). Par exemple, la protéine acide du lactosérum (whey acidic protein ou WAP) est la protéine majeure du lactosérum chez le Rat, la Souris, la Lapine, et le Tamar Wallaby (Trott *et al.*, 2003), elle est décelable chez la Truie (Rival *et al.*, 2001), le Chameau (Beg *et al.*, 1986) mais n'a pas été décrite chez les autres espèces. La

β -lactoglobuline au contraire est décelable chez la plupart des Mammifères (http://mammary.nih.gov/reviews/gene_expression/Watson001/index.html) mais n'a pas été mise en évidence dans le lait des Rongeurs et de la Lapine.

Les protéines du lait ont deux origines possibles. Elles peuvent être d'origine sanguine comme les immunoglobulines et l'albumine sérique, ou néo-synthétisées par la glande mammaire, comme les caséines et les protéines du lactosérum : l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline, la WAP et la lactoferrine. La transferrine du lait présente la particularité de pouvoir être d'origine mammaire ou sanguine selon les espèces (Banfield *et al.*, 1991 ; Chen & Bissell, 1987).

Le but du présent article consiste à décrire la régulation de la production de lait. Nous nous sommes intéressés d'une part à la régulation de la synthèse des protéines du lait dans la glande mammaire et d'autre part au processus d'élaboration des structures supramoléculaires du lait que sont les globules gras et les micelles de caséines.

La synthèse des protéines du lait par la glande mammaire provient de la traduction des ARNm des protéines du lait, eux-mêmes codés par les gènes des protéines du lait. L'expression de ces gènes est spécifiquement mammaire, elle est restreinte aux cellules épithéliales. Elle est de plus régulée en fonction du stade de développement de la glande mammaire, permettant d'atteindre une accumulation maximale de transcrits pendant la lactation (Rudolph *et al.*, 2003). Une large part de cette régulation est contrôlée par les hormones lactogènes, prolactine (PRL) et stéroïdes. Les glucocorticoïdes ont un rôle amplificateur de l'action de la PRL alors que la progestérone a un rôle inhibiteur.

Quelques lignées de cellules mammaires immortalisées expriment soit l'un des gènes des protéines du lait, celui de la β -caséine, soit plusieurs gènes des protéines du lait mais uniquement dans des conditions bien précises, en général à des passages précoces et lorsque les cellules sont cultivées à confluence sur des milieux enrichis en matrice extracellulaire. Il s'agit de cellules mammaires de souris : HC11 (Ball *et al.*, 1988), KIM 2 (Gordon *et al.*, 2000), CID 9 (Schmidhauser *et al.*, 1990) ou de cellules mammaires bovines (German & Barash, 2002). Les interactions des cellules avec la matrice extracellulaire, comme les contacts entre cellules et leur polarité, jouent vraisemblablement un rôle déterminant dans l'expression maximale de ces gènes (Lin *et al.*, 1995 ; Schmidhauser *et al.*, 1990). L'expression de ces gènes n'est pas détectée dans la plupart des cellules mammaires tumorales en lignées établies.

Cette expression est donc soumise à un contrôle bien défini, permettant une expression tissu spécifique, dans un contexte cellulaire et hormonal tout à fait précis.

Si les mécanismes du contrôle hormonal de l'expression de ces gènes par la PRL et les glucocorticoïdes sont maintenant bien décrits, ceux permettant la spécificité tissulaire et la régulation de l'expression de ces gènes en fonction des interactions cellulaires restent encore à découvrir.

Le lait est un fluide complexe composé notamment de sucres, de lipides, présents sous forme de globules, et de

protéines dont certaines agrégées constituent les micelles de caséines. La régulation de l'assemblage de ces constituants du lait en structures supra-moléculaires, dans la cellule mammaire, reste par ailleurs à préciser.

Les travaux de recherche actuellement en cours et les résultats obtenus dans ces deux domaines seront abordés dans les pages suivantes.

MÉCANISMES RÉGULANT L'EXPRESSION DES GÈNES DES PROTÉINES DU LAIT

Bien qu'une part de la régulation de l'expression des gènes des protéines du lait au cours de la gestation et de la lactation puisse avoir pour origine des variations de stabilité des ARNm (Blum *et al.*, 1989 ; Houdebine *et al.*, 1978 ; Poyet *et al.*, 1989), la majeure partie de la régulation est d'origine transcriptionnelle. Cette régulation transcriptionnelle a été largement décrite et fait appel à de nombreuses régions régulatrices qui ont été localisées, le plus souvent en amont des gènes.

Notre laboratoire a choisi d'étudier deux types de gènes, considérés comme gènes modèles, qui ont une expression spécifique de la glande mammaire, et qui présentent des caractéristiques assez différentes : le gène WAP d'une part et les gènes caséine- α S1 et caséine- β d'autre part.

Le gène WAP de Lapin ou de Souris code pour une protéine détectée en abondance dans le lait de ces animaux. C'est un petit gène qui s'étend sur 1,8 à 2,8 kb selon les espèces. Il est composé de 4 exons localisés entre les gènes *ramp3* et *cpr2*, qui sont exprimés dans de nombreux tissus (Rival-Gervier *et al.*, 2003). Son expression est détectée par des analyses de type Northern à partir de la mi-gestation, elle est maximale en lactation.

Les gènes de la caséine- α S1 et de la caséine- β appartiennent à la famille des gènes des caséines. Ils s'étendent sur des régions beaucoup plus grandes que le gène WAP (16 kb à 19 kb) (Rijnkels, 2002), et sont morcelés en un nombre d'exons variable selon le gène considéré et les espèces : 8 ou 9 exons pour le gène de la caséine- β , 16 à 34 exons pour la caséine- α s1 (Rijnkels *et al.*, 2003). Ces deux gènes de caséines sont groupés avec les autres membres de la même famille sur le chromosome 5 chez la Souris (Gupta *et al.*, 1982) et sur le chromosome 15 chez le Lapin (Pauloin *et al.*, 2002). Ils sont exprimés chez tous les Mammifères dès le premier tiers de la gestation, donc un peu plus précocement que le gène de la WAP chez la Souris et la Lapine (Harris *et al.*, 1991 ; Puissant *et al.*, 1994 ; Rudolph *et al.*, 2003).

Les régions situées en amont des gènes WAP, caséine- α S1 et caséine- β sont conservées entre espèces et portent des éléments pouvant interagir avec Stat5

Les séquences des régions régulatrices des gènes WAP et caséines présentent certaines caractéristiques communes.

La comparaison des séquences en amont du gène de la WAP chez le Lapin et la Souris révèle l'existence de trois régions conservées situées vers - 6 kb, - 3 kb et dans la

région proximale. Les deux séquences de Lapin et de Souris, analysées avec le logiciel TF Search, montrent la présence de 5 sites de fixation potentielle pour le facteur de transcription Stat5 (Signal transducer and activator of transcription). Trois de ces sites sont présents au sein des trois régions conservées et fixent le facteur de transcription Stat5 *in vitro* (Millot *et al.*, 2003). Lorsque ces régions sont greffées sur un gène rapporteur et introduites dans des cellules mammaires (transfection) cultivées en présence d'hormones lactogènes, elles sont indispensables pour obtenir un fort niveau d'expression du gène rapporteur (Devinoy *et al.*, 1991; Doppler *et al.*, 1991).

La situation est tout à fait semblable pour les gènes des caséines. En amont des gènes de la caséine- α S1 (Meade *et al.*, 1990) et de la caséine- β (Rijnkels *et al.*, 2003; Schmidhauser *et al.*, 1992), entre - 1.5 kb et - 6 kb selon les espèces (Rijnkels *et al.*, 2003), des éléments de réponse à Stat5, indispensables à une forte expression du gène caséine- β lors d'expériences de transfection dans des cellules mammaires (Byatt *et al.*, 1990; Winklehner-Jennewein *et al.*, 1998), ont été identifiés. Des éléments de réponse à ce facteur de transcription ont également été décrits dans les régions proximales en amont de la plupart des gènes des protéines du lait (Demmer *et al.*, 1995; Doppler *et al.*, 1989; Rosen *et al.*, 1999). Ce résultat n'est pas surprenant puisque Stat5 est un facteur de transcription dont l'activité est modulée en réponse à la prolactine suite à l'activation de la kinase jak2 (Gouilleux *et al.*, 1994).

Les régions régulatrices situées en amont de ces gènes contrôlent l'expression d'un gène rapporteur *in vivo*

Les résultats décrits ci-dessus montrent que ces régions sont capables de contrôler *in vitro* l'expression de gènes rapporteurs en réponse à la prolactine. Afin de savoir si elles correspondent à l'ensemble des éléments nécessaires pour contrôler, *in vivo*, l'expression spécifiquement dans la glande mammaire pendant la lactation, elles ont été greffées sur des gènes rapporteurs et les gènes chimériques introduits dans des œufs de souris pour produire des souris transgéniques.

L'expression d'un gène rapporteur piloté par les régions régulatrices situées en amont du gène WAP (6 kb) est tout-à-fait semblable à celle du gène WAP endogène (Thépot *et al.*, 1995) dans la plupart des lignées établies. Il est vraisemblable que cette région de 6 kb porte l'essentiel des éléments régulateurs permettant l'expression du gène WAP dans la glande mammaire, à un fort niveau pendant la lactation (Devinoy *et al.*, 2005). Des expériences similaires ont été réalisées avec les régions situées en amont des gènes caséine- α s1, caséine- α s2, caséine- β et caséine- κ . Les résultats montrent que les régions situées en amont des gènes caséine- α s1 ou caséine- β ne permettent l'expression de ces gènes, à des niveaux comparables à ceux des gènes endogènes des caséines (Meade *et al.*, 1990), que dans quelques lignées de Souris. Celles situées en amont des gènes caséine- α S2 de Souris (Kolb, 2002) ou des gènes caséine- κ de Chèvre (Persuy *et al.*, 1995) ou de Lapin (Baranyi *et al.*, 1996)

sont encore moins efficaces. Certains éléments régulateurs seraient donc plus éloignés des gènes et peut-être partagés entre plusieurs gènes des caséines.

Ces régions portent d'autres éléments régulateurs

L'analyse des séquences des régions régulatrices utilisées dans les expériences mentionnées ci-dessus montre que ces régions ne portent pas que des éléments potentiels de fixation pour Stat5. De nombreuses autres séquences consensus susceptibles d'interagir notamment avec les diverses formes de NF1 (Li & Rosen, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 2001) d'ets (Galang *et al.*, 2004; Mcknight *et al.*, 1995; Welte *et al.*, 1994), de C/EBP (Wyzomierski & Rosen, 2001) ou de YY1 (Meier & Groner, 1994) sont présentes et s'étendent jusque 7 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Les régions régulatrices de ces gènes sont donc composées de nombreux éléments de réponse et ont été baptisées "Complexe responsive elements" (CoRE) (Rosen *et al.*, 1999). Par des expériences semblables à celles décrites ci-dessus, il a été montré qu'un certain nombre d'entre elles jouent un rôle de modulateur de l'expression des gènes des protéines du lait et sont capables d'interagir avec les facteurs de transcription présents dans la glande mammaire. Toutefois, aucun élément de réponse aux glucocorticoïdes (*glucocorticoid responsive element*, GRE) n'a été clairement mis en évidence dans ces régions régulatrices, bien que l'expression des gènes des protéines du lait soit amplifiée par ces hormones. Par contre, des séquences qui correspondent à des demi GRE pourraient jouer un rôle en coopérant avec des éléments fixant Stat5 situés à proximité (Welte *et al.*, 1993). Le récepteur des glucocorticoïdes pourrait également interagir avec Stat5 et ainsi amplifier l'expression des gènes induite par la prolactine (Lechner *et al.*, 1997; Stocklin *et al.*, 1996).

Ces nombreux régulateurs, le récepteur de la PRL, les kinases jak2, Stat5, le récepteur des glucocorticoïdes, NF1, ets, C/EBP, YY1 ne sont toutefois pas spécifiques de la cellule mammaire, même s'ils présentent parfois des isoformes particulières dans ce tissu (Murtagh *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005). Leur combinatoire ne paraît pas être suffisante pour expliquer l'expression spécifique de ces gènes des protéines du lait dans la cellule mammaire.

Une explication possible est que dans le noyau des cellules mammaires une organisation nucléaire particulière régule l'accessibilité des facteurs de transcription à leurs séquences cibles sur l'ADN. En effet, dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN n'est pas nu mais associé à de nombreuses protéines constituant la chromatine.

Autour de ces régions régulatrices, la structure de la chromatine varie

L'assemblage d'ADN et de protéines nucléaires est bien visible au microscope, sous forme de régions plus ou moins denses aux électrons, définies par E. Heitz en 1928 en tant qu'euchromatine et hétérochromatine. L'organisation de la fibre de chromatine dans le noyau *in vivo* est encore largement discutée (Lesne & Victor, 2006;

Schiessel, 2006). Toutefois, il est possible *in vitro*, dans des conditions particulières, de décondenser cette structure et d'observer en microscopie électronique une fibre de 30 nm de diamètre sous forme de tresse, qui peut encore être décondensée en un collier de perles de 11 nm de diamètre, permettant d'observer les nucléosomes (Zlatanova *et al.*, 1998). Les nucléosomes sont constitués d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3, H4, autour duquel vient s'enrouler l'ADN. Cet enroulement de la fibre de chromatine est variable en fonction de l'acétylation des lysines présentes sur les queues N terminales des histones H3 et H4. Lorsque ces lysines ne sont pas acétylées, les queues N terminales de ces histones sont chargées positivement. Elles interagissent alors fortement avec l'ADN qui est chargé négativement. Le positionnement précis des nucléosomes sur l'ADN permet alors des interactions entre eux, ce qui favorise la compaction de la chromatine. Cette structure hypoacétylée est souvent associée à un ADN relativement méthylé au niveau des séquences CpG. Ces régions d'ADN méthylées recrutent une protéine de type MeCP2 qui recrute elle-même des histones déacétylases et maintient la chromatine dans un état condensé. Cette structure a tendance à se propager le long de la fibre. Au contraire, lorsque ces histones sont acétylées, elles deviennent chargées négativement, les interactions entre les histones et l'ADN sont faibles, les nucléosomes sont mobiles et permettent une meilleure accessibilité des séquences d'ADN à la machinerie transcriptionnelle. Les régions hyperacétylées correspondent en général à des régions d'ADN peu méthylées au niveau des séquences CpG. Dans certains cas toutefois, la courbure de l'ADN imposée par le positionnement des nucléosomes peut être favorable à la transcription.

Autour des régions régulatrices du gène de la WAP décrites au paragraphe précédent, la structure de la chromatine est variable en fonction des tissus et du stade physiologique (Li & Rosen, 1994; Millot *et al.*, 2003).

Dans la glande mammaire de Lapine, une seule des trois régions régulatrices est présente au sein d'une structure chromatiniennne ouverte quel que soit le stade étudié : 8 jours de gestation, lactation ou 1 mois après le sevrage. En lactation, les deux autres régions régulatrices localisées à -6 kb et au niveau de l'initiation de la transcription sont également au sein de structures chromatiniennes ouvertes. Cette structure est différente de celle observée un mois après le sevrage. La région la plus distale se trouve alors à nouveau dans une structure fermée (Millot *et al.*, 2003). Dans tous les cas, l'ADN (analysé par digestion avec des enzymes de restriction sensibles à la méthylation) est relativement déméthylé au niveau de ces régions régulatrices (données personnelles, non publiées). La variation de structure chromatiniennne observée entre -6 kb et l'initiation du gène WAP peut donc favoriser une plus ou moins grande accessibilité de Stat5 à ses séquences cibles et permettre d'expliquer le niveau variable d'expression de ce gène dans la glande mammaire.

Par contre, dans le foie, ces trois mêmes régions sont au sein de structures chromatiniennes fermées. L'ADN est relativement méthylé ce qui permet d'expliquer que l'expression de ce gène ne soit pas activée dans ce tissu.

La structure de la chromatine est ouverte autour des gènes *ramp3* et *cpr2*

Encore plus en amont du gène, chez la Souris comme chez le Lapin, une région à structure chromatiniennne ouverte est détectée dans le foie comme dans la glande mammaire. De même, en aval du gène, une large région à structure chromatiniennne ouverte est détectée dans les deux tissus. Ces deux régions correspondent à des régions d'ADN peu méthylé dans le foie comme dans la glande mammaire. Elles se situent au voisinage des gènes *ramp3* et *cpr2*, qui flanquent le gène WAP en amont et en aval, et qui, contrairement au gène WAP, sont exprimés dans de nombreux tissus (Edwards *et al.*, 1997; McLatchie *et al.*, 1998).

Dans le foie, entre ces régions à structure chromatiniennne ouverte et la région à structure chromatiniennne fermée, de type hétérochromatine correspondant à un ADN très méthylé, qui entoure le gène de la WAP, doivent exister des régions limitant la progression de l'hétérochromatine. Plusieurs type d'éléments ont été décrits comme pouvant jouer le rôle de barrière limitant la progression de l'hétérochromatine (Brasset & Vauray, 2005; Fourel *et al.*, 2004).

Limite entre structures chromatiniennes ouvertes ou fermées – Régions d'Attachement à la Matrice nucléaire

A la limite entre la région entourant le gène WAP, qui a une structure chromatiniennne fermée dans le foie, et les régions flanquantes entourant les gènes *ramp3* et *cpr2*, qui ont une structure chromatiniennne ouverte, nous avons prédit l'existence de régions potentielles d'attachement de l'ADN à la matrice nucléaire (*Matrix Attachment Region* ou MAR) (Iarovaia *et al.*, 2005) chez le Lapin comme chez la Souris (données personnelles non publiées). Ces régions, détectées par le logiciel MARWIZ à partir de la séquence nucléotidique de l'ADN, sont des régions riches en AT, susceptibles d'adopter des structures secondaires mais qui ne correspondent pas à des séquences consensus évidentes. Elles pourraient interagir avec des protéines associées à des structures nucléaires spécifiques (matrice nucléaire) définissant des boucles indépendantes de chromatine (Mirkovitch *et al.*, 1984).

Les MAR peuvent être en association avec de nombreuses protéines comme l'actine (Ivanenko & Avramova, 1992), SAF-B (Renz & Fackelmayer, 1996), SATB1 (de Belle *et al.*, 1998), la nucléoline (Dickinson & Kohwi-Shigematsu, 1995) et la topoisomérase II (Avramova & Paneva, 1992). Cette dernière pourrait jouer un rôle crucial dans la structure de la chromatine et participer à l'organisation des boucles de chromatine dans le noyau (Poljak & Kas, 1995). Cette enzyme possède deux activités, DNase et ADN polymérase. Cette dernière activité polymérase peut être inhibée spécifiquement *in vivo* par une drogue, le téniposide (VM26), qui n'altère pas l'activité nucléase de l'enzyme (Iarovaia *et al.*, 2004). En présence de VM26, l'activité DNase de la Topoisomérase II va ainsi cliver l'ADN

situé à proximité de l'enzyme, et par la position des sites de coupure induits permettre de cartographier certaines MAR (Iarovaia *et al.*, 2004). Des résultats préliminaires montrent qu'une des régions MAR détectées par le logiciel MARWIZ en aval du gène WAP de Souris, au niveau du gène *cpr2*, serait en interaction avec la topoisomérase II, dans une lignée mammaire de Souris qui n'exprime pas le gène WAP (données personnelles non publiées). Cette MAR pourrait induire une partition de la chromatine en boucles indépendantes les unes des autres, qui pourraient être variables selon le niveau d'expression du gène WAP.

L'expression du gène caséine- α 1 de Lapin est associée à l'attachement de la boucle d'ADN contenant le gène à une structure nucléaire

Afin de voir s'il existe une relation entre expression des gènes et interactions des boucles de chromatine (déliimitées par des MAR) portant ces gènes avec des structures nucléaires, un modèle cellulaire a été construit. Les cellules mammaires de Souris de la lignée HC11 appartiennent à une des rares lignées qui exprime un gène des protéines du lait, celui de la caséine- β , lorsque les cellules sont cultivées en présence de prolactine. Le gène de la caséine- α 1 de Lapin a été introduit en multiples copies dans ces cellules et des clones cellulaires, exprimant ce gène caséine- α 1 à divers niveaux, ont été sélectionnés.

L'attachement des boucles de chromatine, portant le gène caséine- α 1 de Lapin, à des structures nucléaires a été observé par hybridation *in situ*, après solubilisation des histones par un traitement hyperosmotique. Dans ces conditions, les boucles de chromatine qui ne sont pas en interaction forte avec des structures nucléaires sortent par les pores nucléaires, constituant des halos autour des noyaux (Gerdes *et al.*, 1994). De telles expériences révèlent que dans des cellules exprimant le gène de la caséine- α 1 de Lapin à un fort niveau, les boucles de chromatine, qui portent ce gène, restent confinées dans le noyau. Elles sont donc en forte interaction avec des structures nucléaires. Au contraire dans des cellules exprimant la caséine- α 1 de Lapin à un plus faible niveau, ces boucles sortent par les pores nucléaires, montrant ainsi que leurs interactions avec les structures nucléaires sont plus faibles (Poussin *et al.*, 2005).

Dans cette lignée de cellules mammaires de Souris, le gène de la caséine- α 1 de Souris n'est pas exprimé, mais des résultats préliminaires semblent indiquer qu'il existerait de même une relation entre l'expression du gène endogène de la caséine- β en réponse aux hormones lactogènes et l'attachement à des structures nucléaires de la boucle de chromatine qui porte ce gène (données personnelles non publiées). Ces résultats restent à confirmer en étudiant l'attachement à la matrice d'un gène qui n'est pas exprimé dans ces cellules.

Organisation nucléaire des gènes caséines et WAP

Au-delà de l'organisation des boucles de chromatine dans le noyau, il a été montré que les chromosomes peu-

vent occuper des territoires spécifiques (Cremer & Cremer, 2001) et que le positionnement des chromosomes dans le noyau peut dépendre de leur densité en gènes. Le chromosome HSA19, riche en gènes, occupe par exemple une position relativement plus centrale que le chromosome HSA18 qui est de même taille, mais pauvre en gènes (Tanabe *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il a été montré que la position des gènes Hoxb1 et Hoxb9 par rapport à leur territoire chromosomique varie au cours du développement de l'embryon de souris et que ce changement de localisation correspond à leur niveau d'expression (Chambeyron *et al.*, 2005). De même, il a été montré que la position des gènes de globine varie également au cours de la différenciation érythrocytaire (Francastel *et al.*, 2001). Dans de nombreux modèles, des résultats récents attribuent ainsi à l'architecture nucléaire un rôle de plus en plus important (Misteli, 2004).

Des travaux préliminaires montrent que nous pouvons localiser les gènes WAP et caséines dans le noyau en interphase. Nous envisageons de regarder leur localisation par rapport aux territoires chromosomiques auxquels ils appartiennent, par rapport à la périphérie nucléaire, par rapport aux centromères ou aux télomères, et de les localiser les uns par rapport aux autres, dans des cellules qui expriment ou non ces gènes.

Analyse du transcriptome et du protéome en réponse aux hormones lactogènes

En réponse aux hormones lactogènes, de nombreux gènes autres que les deux gènes modèles décrits ci-dessus sont activés (Gass *et al.*, 2003 ; Rudolph *et al.*, 2003 ; Suchyta *et al.*, 2004 ; Galio *et al.*, 2005). Il s'agit de gènes codant pour des protéines jouant un rôle dans les interactions cellulaires et la signalisation (diminution de la voie Wnt, β -caténine, stimulation de la voie Akt, IRS, SREBP-1, IGF-I), la synthèse des sucres du lait (lactose) tel que l' α -lactalbumine, la synthèse protéique et la lipogénèse. Enfin, il s'agit de l'ensemble des protéines qui vont participer aux processus d'assemblage des produits du lait en structures supramoléculaires: globules lipidiques et micelles (Wu *et al.*, 2000a).

LES STRUCTURES SUPRAMOLÉCULAIRES DU LAIT

Comme indiqué par ce qui précède, le lait est un fluide biologique extrêmement complexe. Le fait qu'il soit multiphasique participe à cette complexité. En plus des phases aqueuse et gazeuse, les gaz dissous pouvant représenter 4 à 5 % du volume à la sortie de la mamelle, le lait comporte une phase dite colloïdale et une phase lipidique. La phase colloïdale est constituée par les agrégats de caséines, ou micelles de caséines, en suspension dans la phase aqueuse. La phase lipidique, sous forme d'émulsion, est constituée à 97 % de triglycérides et se présente sous forme de globules lipidiques appelés globules gras.

Il faut noter que la structure de ces assemblages supra-moléculaires conditionne les propriétés technologiques du lait.

Les globules gras

Le globule gras du lait est constitué d'un noyau de triglycérides enveloppé par une double membrane de phospholipides cellulaires. Les caractéristiques de cette enveloppe conditionnent la stabilité et la fonctionnalité de la fraction butyrique du lait. Elle contient aussi des protéines qui interviennent dans les mécanismes d'oxydo-réduction, dans les phénomènes de maturation et d'affinage. La taille moyenne des globules gras varie selon l'espèce, la race, mais aussi en fonction du stade de lactation et de l'alimentation. Dans le lait de vache, le diamètre des globules gras varie de 0,2 à 15 μm , avec un diamètre moyen de 4 μm (Walstra, 1995). La composition et la taille des globules gras déterminent l'aptitude au barattage des crèmes.

Assemblage des globules gras

Les travaux pionniers de Ian Mather et de Tomas Keenan ont abouti au modèle suivant d'élaboration et de sécrétion du globule gras (pour revue voir Heid & Keenan, 2005 ; Mather & Keenan, 1998). A l'origine, des gouttelettes de triacylglycérol se formeraient sur ou à l'intérieur de la bicouche phospholipidique de la membrane du réticulum endoplasmique, écartant les deux feuillettes de la membrane de ce compartiment. A ce jour, on ne sait pas si la fabrication de ces gouttelettes a lieu au niveau d'un sous-domaine spécialisé du réticulum endoplasmique. Ces micro-gouttelettes lipidiques primaires seraient libérées dans le cytosol, enveloppées d'une monocouche de phospholipides provenant de la membrane du réticulum endoplasmique et d'un certain nombre de protéines spécifiques (voir plus bas). Cette membrane monocouche aurait des caractéristiques qui suggèrent qu'elle dériverait plutôt du feuillet cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique. Ces micro-gouttelettes sont ensuite transportées de façon vectorielle vers la membrane apicale de la cellule épithéliale mammaire. Cette étape pourrait faire intervenir les éléments du cytosquelette. Cependant, la colchicine ne semble pas inhiber la sécrétion des lipides (Daudet *et al.*, 1981). Au cours de ces étapes de transport, les micro-gouttelettes lipidiques auraient la possibilité de fusionner entre elles, jusqu'à un certain seuil. On ne sait pas si c'est là l'unique mécanisme impliqué dans leur croissance et si ce processus est régulé. Quoi qu'il en soit, des structures de toutes tailles sont observées dans la cellule (moins de 0,5 μm jusqu'à plus de 4 μm), les gouttelettes plus grandes étant situées à proximité de la membrane apicale. Les gouttelettes lipidiques sont enfin enveloppées par une région de la membrane apicale de la cellule et libérées par bourgeonnement dans la lumière des acini, entourées de la bicouche phospholipidique dérivée de la membrane plasmique. En final, c'est donc bien 3 feuillettes de phospholipides qui entourent le noyau de triglycérides. Tous ces événements ont été décrits en termes

généraux, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu pour l'élaboration des gouttelettes lipidiques, leur fusion, leur transport intracellulaire et leur sécrétion sont très largement inconnus.

Les protéines impliquées dans la biogenèse du globule gras

Au cours de l'enveloppement de la gouttelette lipidique par la membrane apicale de la cellule épithéliale mammaire, un espace constant de 10-20 nm est maintenu entre la monocouche de phospholipides de la gouttelette et le feuillet cytosolique de la membrane plasmique qui l'entoure. Cet espace est rempli de façon homogène par un matériel dense aux électrons en microscopie électronique, apparemment de nature protéique. Les protéines de la membrane du globule gras et des gouttelettes lipidiques intracellulaires ont été en partie identifiées (pour revue voir Mather, 2000 ; Wu *et al.*, 2000b) et au moins quatre d'entre elles appartiendraient à ce manteau protéique. Il s'agit de la butyrophiline, une glycoprotéine transmembranaire, de la xanthine oxydoréductase, de l'adipophiline (aussi appelée *adipocyte differentiation-related protein* ou ADRP) et de la TIP 47. Seule la butyrophiline est spécifiquement exprimée dans la glande mammaire. Au cours de son transport dans la voie de sécrétion, cette protéine qui peut représenter 20 à 40 % des protéines de la membrane du globule gras est spécifiquement dirigée vers la membrane apicale de la cellule. A l'état d'équilibre, la butyrophiline est essentiellement retrouvée à la membrane apicale des cellules. La xanthine oxydase est une protéine cytosolique. Cependant, dans la cellule épithéliale mammaire en lactation, elle aussi est concentrée à la membrane apicale. En fait, de nombreux éléments expérimentaux permettent de conclure que les deux protéines interagissent entre elles spécifiquement. Par ailleurs, des preuves directes de l'implication de ces protéines dans la sécrétion des globules gras ont été obtenues chez des souris dans lesquelles l'expression de ces protéines a été partiellement ou totalement supprimée par invalidation de gène (Ogg *et al.*, 2004 ; Vorbach *et al.*, 2002). L'adipophiline et la TIP 47 sont aussi des protéines cytosoliques. Elles appartiennent à la famille des protéines PAT, pour Périlipine-Adipophiline-TIP 47, toutes connues pour s'associer aux gouttelettes lipidiques (pour revue voir Londos *et al.*, 2005 ; Pauloin *et al.*, 2004). Il existe cependant un pool cytosolique de TIP 47 non associé aux gouttelettes lipidiques. Ces protéines sont exprimées dans beaucoup d'autres types cellulaires et sont associées aux gouttelettes lipidiques dans tous les types de cellules testés. Nous avons d'ailleurs mis en évidence leur association aux gouttelettes lipidiques induites par l'acide oléique dans les cellules HC11 (A. Pauloin, résultats non publiés). Contrairement à la butyrophiline et à la xanthine oxydase, un rôle direct de l'adipophiline ou de la TIP 47 dans l'étape de sécrétion des globules gras n'a pas été établi. Les données expérimentales sont plutôt en faveur d'un rôle de l'adipophiline dans les étapes précoces de la formation des gouttelettes lipidiques au niveau du réticulum endoplasmique. Il a aussi été suggéré qu'elle puisse jouer un rôle

dans la fusion des gouttelettes entre elles. Cependant, il est clair qu'au cours de la sécrétion des gouttelettes lipidiques, l'adipophiline devient partie intégrante du manteau protéique de la membrane du globule gras. La TIP 47 est aussi retrouvée dans les globules gras. Quoiqu'il en soit, son rôle reste totalement inconnu. L'hypothèse actuellement défendue est que les interactions entre la butyrophiline transmembranaire, la xanthine oxydase et l'adipophiline associée aux gouttelettes lipidiques induiraient l'accolement de la gouttelette lipidique avec la membrane plasmique, étape nécessaire pour que le processus de bourgeonnement et la libération du globule gras dans le lait aient lieu.

Existe-t-il une régulation commune de la production des protéines et des lipides du lait ?

Lorsque l'on compare le taux de matière grasse et le taux de protéine dans les laits de différentes espèces, on s'aperçoit qu'il existe une corrélation positive entre ces deux variables. Ceci suggère qu'il existerait une sorte de couplage vertueux de la production des lipides et des protéines du lait (pour revue voir Ollivier-Bousquet, 2002). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. Quoiqu'il en soit, il est remarquable que les premières étapes de la biogenèse des principaux composants du lait, globules gras et micelles de caséines, prennent place dans le même compartiment cellulaire, le réticulum endoplasmique. Des interactions entre le processus d'élaboration de ces différents composés sont donc hautement probables. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que plusieurs protéines du réticulum endoplasmique, la protéine disulfide isomérase, la protéine de liaison des immunoglobulines (BiP/GRP 78) et la calréticuline, ont été identifiées sur les gouttelettes lipidiques (Ghosal *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2000b). De même, rappelons que la formation de la membrane externe du globule gras, au détriment de la membrane plasmique apicale de la cellule, dépend de l'apport de membrane et de butyrophiline à cette membrane, et que ce matériel est apporté par la voie de sécrétion.

Les micelles de caséines

Dans le lait, les caséines sont sous forme d'agrégats pouvant contenir 10 000 chaînes des quatre caséines (chez le Rat et la Souris, il existe une cinquième caséine) et 3 à 4 000 micro-granules de phosphate de calcium : ce sont les micelles de caséines (pour revue voir De Kruif & Holt, 2003). Les micelles sont très hétérogènes en taille chez un même individu et il y a aussi une grande dispersion de la taille moyenne en fonction des espèces. Le rayon moyen n'est que d'une trentaine de nm chez l'Homme, espèce exprimant la plus faible quantité de caséines, alors qu'il est supérieur à 260 nm chez le Dromadaire. L'association des caséines entre elles fait clairement intervenir des interactions de type hydrophobe, des ponts hydrogènes et le masquage des forces de répulsion électrostatiques (les caséines sont des protéines acides) par liaison de calcium. De plus, en ce qui concerne

les caséines modifiées sur leur site de phosphorylation multiple (caséine- α S1, - α S2 et - β), des micro-granules de phosphate de calcium se lient à 3-5 groupes de phosphorines chargés négativement portés par différentes caséines. Ceci permet à la fois de réduire la charge des protéines portées par les groupements de phosphate, et donc les forces de répulsion, et de créer un pontage électrostatique entre les caséines.

Structure de la micelle de caséine

L'arrangement spécifique des caséines dans la micelle, s'il en existe un, n'a toujours pas été défini et il reste encore énormément à apprendre sur le rôle de chacune d'entre elles dans le processus d'agrégation. De plus, nous manquons aussi cruellement d'information sur la structure tridimensionnelle des caséines, aucune d'entre elles n'ayant été cristallisée. De fait, un grand nombre de modèles ont été construits au cours du temps pour expliquer la mésostructure de la micelle et le lecteur peut se référer à une abondante littérature (voir les revues suivantes et les articles qui y sont cités, De Kruif & Holt, 2003; Holt, 1992; Horne, 1998; Schmidt, 1982; Walstra, 1990). Quoiqu'il en soit, il est généralement admis que la caséine- κ aurait tendance à se situer à la périphérie de la micelle, jouant un rôle à la fois de limitation dans la croissance de la micelle et de maintien de celle-ci en suspension dans le lait (Horne, 1998). En effet, la moitié C-terminale de la protéine est particulièrement hydrophile et chargée, portant l'ensemble des modifications post-traductionnelles de la protéine, essentiellement des glycosylations (O-glycosylation). Rappelons à cet égard que la coupure de la caséine- κ par la chymosine libère cette partie C-terminale de la protéine et provoque la coagulation des micelles. C'est la formation du caillé. Cependant, il n'y a pas de preuve définitive que la caséine- κ se situe intégralement à la périphérie de la micelle. Un autre concept qui reste controversé et dont le schéma évolue est l'idée de l'existence de sous-unités dans la micelle : les sous-micelles. Dans le modèle de Schmidt (Schmidt, 1982) et Walstra (1990), l'ensemble des caséines s'associent en proportion appropriée pour former une sous-micelle. Les micro-granules de phosphate de calcium constitueraient alors le ciment liant ces sous-unités les unes aux autres dans la micelle. Dans le modèle de Holt ("*tangled web model*" ou "*hairy model*"; Holt, 1992), la micelle est considérée comme un gel protéique minéralisé dans lequel les micro-granules de phosphate de calcium constitueraient l'agent de liaison dans le maillage et stabiliseraient le réseau de caséines. Dans ce modèle, la surface de la micelle serait une simple extension de sa structure interne, sauf peut-être en ce qui concerne la caséine- κ . Dans notre opinion, ce modèle offre aussi une grande liberté pour que la caséine- κ se place préférentiellement en périphérie de la micelle, celle-ci ne portant qu'une phosphosérine et étant donc beaucoup moins encline que les autres caséines à interagir avec le phosphate de calcium. Cette caséine interagirait avec les autres caséines plutôt par l'intermédiaire de sa partie N-terminale qui est hydrophobe.

Assemblage de la micelle dans la cellule épithéliale mammaire

Les études morphologiques ont permis de conclure que l'association des caséines en micelles est initiée dans les citernes de l'appareil de Golgi, suite à leur phosphorylation dans cet organite et à l'interaction des groupements de phosphosérine avec le phosphate de calcium. Il faut noter à cet égard que toutes les caséines ne sont pas phosphorylées simultanément. La caséine- α S1 se phosphoryle plus rapidement que la caséine- β , et la phosphorylation de cette dernière se poursuit jusque dans les citernes trans de l'appareil de Golgi (Boisgard & Chanut, 2000; Péchoux *et al.*, 2005). Ces agrégats de caséines prennent l'aspect de fibres enchevêtrées denses aux électrons. L'agrégation des caséines se poursuit dans les vésicules de sécrétion pendant leur transport vers la membrane plasmique apicale pour aboutir à une structure plutôt sphérique, identique à celle retrouvée dans le lait, et présentant un aspect typique en nid d'abeille en microscopie électronique. Comme nous l'avons déjà précisé, un modèle alternatif de la structure des micelles de caséines fait intervenir l'existence de sous-unités micellaires. Dans ce contexte, il faut noter que des particules sphériques de petites tailles ont été observées en microscopie électronique dès les compartiments cis de l'appareil de Golgi (Clermont *et al.*, 1993). Il est aussi remarquable que ces structures ne soient jamais observées dans les petites vésicules de transport péri-golgiennes. Il en résulte que la cellule épithéliale mammaire est un des systèmes expérimentaux qui soutient l'hypothèse d'un transport intra-golgien des protéines par maturation des citernes (Clermont *et al.*, 1993), plutôt que par transport vésiculaire (pour revue voir Marsh & Howell, 2002; Mironov *et al.*, 1997; Pelham & Rothman, 2000; Rabouille & Klumperman, 2005). Quoi qu'il en soit, il ressort de ces études que la formation de la micelle dans la voie de sécrétion de la cellule épithéliale mammaire est un processus progressif. Elle dépend aussi d'événements spécifiques comme la phosphorylation des caséines, événement qui a lieu à une étape bien précise du transport de ces protéines dans l'appareil sécrétoire. Il existe donc une dimension spatio-temporelle dans le processus cellulaire d'édification de la micelle. Nous sommes persuadés qu'à l'heure actuelle, une étude *in vivo* de la biogenèse de la micelle permettra d'affiner de façon substantielle notre connaissance de la mésostructure micellaire. Une telle étude permettra aussi de répondre à la question de savoir si l'agrégation des caséines joue un rôle direct dans leur transport dans la voie de biosynthèse.

Rôle des ponts disulfures dans la structuration de la micelle

Comme nous l'avons vu précédemment, pour remplir sa fonction, la caséine- κ aurait tendance à se placer naturellement à l'interface entre le noyau hydrophobe de la micelle formé par les autres caséines et l'environnement aqueux. Dans toutes les espèces étudiées, cette caséine contient au moins une cystéine dans sa partie N-termi-

nale, alors que les autres caséines sont généralement dépourvues de cet acide aminé. Chez les ruminants, il existe une autre cystéine en N-terminal du site de clivage par la chymosine. Étant donnée la grande conservation de ces résidus de cystéine et que la formation des ponts disulfure a lieu dans le réticulum endoplasmique, il était tentant de spéculer que la multimérisation de la caséine- κ pourrait jouer un rôle dans la formation de la micelle. Des résultats concernant la participation des cystéines dans la multimérisation des caséines ont été obtenus chez l'Homme et les bovins (pour revue voir Rasmussen *et al.*, 1999). Nous avons récemment relancé une étude sur ce thème en essayant de généraliser les observations aux caséines- κ d'autres espèces et aux autres caséines, notamment dans les espèces chez lesquelles la majorité des caséines possède une cystéine (Bouguyon *et al.*, 2006).

Nous avons ainsi montré que la caséine- κ existe sous forme multimérique dans le lait de toutes les espèces que nous avons testées. Cependant, la principale originalité de ce travail est d'avoir démontré que toute caséine forme des ponts disulfures avec elle-même, ou avec un autre membre de la famille, pour peu qu'elle possède un résidu cystéine. Ceci est particulièrement évident chez la Souris et le Rat chez lesquels 4 et 5 des caséines (il existe 5 caséines chez les rongeurs) respectivement possèdent au moins une cystéine. De plus, ces caséines forment aussi bien des homodimères que des hétérodimères. Malgré tout, l'oligomérisation des caséines *via* la formation de ponts disulfures est spécifique puisque qu'aucun multimère composé d'une des caséines et d'une autre protéine du lait contenant des cystéines n'a pu être détecté.

La dimérisation de la caséine- κ , sans doute dans une configuration parallèle des deux chaînes (voir discussion dans Bouguyon *et al.*, 2006), présenterait l'avantage de concentrer l'ensemble des caractéristiques hydrophiles d'un seul côté, amplifiant sans doute de façon très importante les propriétés de solvatation de la molécule par rapport au monomère.

Rôle des différentes caséines dans la structuration de la micelle

La nature des caséines constituant la micelle influence l'assemblage de celle-ci et sa mésostructure. Selon les espèces et les races, la proportion de caséine- κ varie. Les laits riches en caséine- κ auront tendance à avoir des micelles de diamètre réduit (Rollema, 1992). L'observation que les vaches exprimant une plus grande quantité de caséine- κ (allèle B) produisent un lait contenant des micelles de caséines dont le diamètre moyen est plus faible va aussi dans ce sens (Van Eenennaam & Medrano, 1991). *A contrario*, les laits proportionnellement pauvres en cette caséine auront des micelles de diamètre plus important. Le Dromadaire est un cas extrême, et comme nous l'avons précisé plus haut, les micelles sont de grande taille dans cette espèce (Farah, 1993). Ce rôle de limitation de la croissance de la micelle de caséine par la caséine- κ a été confirmé au laboratoire par une approche transgénique chez la Souris. La taille moyenne des micelles produites chez des souris exprimant la caséine-

κ de Lapin était inversement corrélée au niveau d'expression du transgène (Hiripi *et al.*, 2000).

Par ailleurs, nous avons montré que la caséine- α S1 est nécessaire pour un transport optimal des autres caséines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Chanat *et al.*, 1999). Pour ce faire, nous avons tiré parti du polymorphisme extrême du gène spécifiant la caséine- α S1 chez la Chèvre (Bevilacqua *et al.*, 2002; Martin & Grosclaude, 1993). Ce polymorphisme est associé à des variations quantitatives de caséine- α S1 dans le lait des animaux. Il existe des allèles associés à une forte quantité de caséine- α S1 dans le lait, des allèles associés à une quantité moyenne, et des allèles faibles. Enfin, il existe des allèles nuls. Chez les animaux homozygotes, l'absence de caséine- α S1 provoque l'accumulation des autres caséines dans la lumière du réticulum endoplasmique et, en conséquence, une distension importante des citernes de ce compartiment. Une modification plus modeste de la morphologie de ce compartiment a été observée chez les animaux homozygotes pour les allèles moyens. Il est remarquable que ce phénomène n'ait pas lieu chez les animaux homozygotes portant un allèle nul du gène spécifiant la caséine- β . L'ensemble de nos résultats suggère qu'il existe une interaction entre les caséines dès le réticulum endoplasmique et que la caséine- α S1 est le maître d'œuvre dans l'élaboration d'une structure micellaire primaire. De plus, il apparaît qu'en promouvant la formation de cet hétéropolymère, la caséine- α S1 induit l'exportation de l'ensemble des autres caséines vers l'appareil de Golgi.

CONCLUSIONS

Pour assurer une production laitière abondante, des relations étroites doivent exister entre le contrôle de la transcription des divers gènes codant pour les constituants du lait et la régulation de la sécrétion de ces produits. Outre les protéines qui sont impliquées dans l'élaboration des structures supramoléculaires décrites ci-dessus, il y a aussi celles qui vont jouer un rôle dans leur transport dans la cellule. Les protéines impliquées dans le transport des caséines au travers des compartiments de la voie de sécrétion en sont un exemple. Ce trafic vésiculaire fait intervenir, entre autres, des modifications locales de la composition lipidique des compartiments subcellulaires impliqués. Ces modifications font intervenir de nombreuses enzymes cytosoliques qui vont modifier la nature des phospholipides. Dans ce contexte, nous avons montré que la phospholipase D et la phospholipase A2 indépendante du calcium étaient nécessaires au bon déroulement de plusieurs étapes de transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ainsi que dans la formation des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans-golgien (Boisgard & Chanat, 2000; Pechoux *et al.*, 2005). En ce qui concerne le cytosquelette, il a été montré que la destruction des microtubules réduit la sécrétion des protéines par la cellule épithéliale mammaire. Un traitement, *in vivo*, par la colchicine inhibe la

sécrétion des protéines du lait (Patton, 1974). L'analyse *in vitro* des effets du nocodazole a permis de montrer que cet autre agent destructeur des microtubules n'affecte pas l'exocytose des protéines du lait mais qu'en revanche, la drogue inhibe le transport des protéines du Golgi vers la membrane plasmique (Rennison *et al.*, 1992). Il a été suggéré que le réseau de microtubules serait impliqué dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi et/ou dans la formation des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans-Golgien. Enfin, les interactions étroites entre cellules épithéliales mammaires, entre ces cellules et la matrice extracellulaire, et entre ces cellules et les autres types de cellules qui composent la glande mammaire (Sakakura, 1991), participent largement à la régulation de la transcription, à l'organisation nucléaire (Lelievre & Bissell, 1998), ainsi qu'aux mécanismes de transport intracellulaire des constituants du lait qui dépendent en grande partie de la mise en place et du maintien de la polarité cellulaire.

Remerciements. – Mohamed BAGHER MONTBAZER TORBATI a bénéficié d'une bourse de thèse franco-iranienne gérée par la Sfere, Adrian BALTEANU d'une bourse dans le cadre du VI^{ème} projet Européen Marie Curie "Early Stage Training", contrat numéro MEST-CT-2004-504854. Une grande partie des résultats concernant l'organisation nucléaire a été obtenue grâce aux excellents conseils de Hélène HAYES. Les auteurs souhaitent par ailleurs remercier tout particulièrement André CALAS et Michèle OLLIVIER-BOUSQUET pour leur invitation à présenter nos résultats à la réunion de la Société de Biologie Cellulaire et Michèle OLLIVIER-BOUSQUET pour son soutien au cours de ce travail ainsi que pour son dynamisme dans la direction de l'unité.

BIBLIOGRAPHIE

- Avramova Z. & Paneva E., Matrix attachment sites in the murine α -Globin Gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1992, 182, 78-85.
- Ball R. K., Friis R. R., Schoenenberger C. A., Doppler W. & Groner B., Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120 kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.*, 1988, 7, 2089-2095.
- Banfield D. K., Chow B. K. C., Funk W. D., Robertson K. A., Umelas T. M., Woodworth R. C. & Macgillivray R. T. A., The nucleotide sequence of rabbit liver transferrin cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1089, 262-265.
- Baranyi M., Aszodi A., Devinoy E., Fontaine M. L., Houdebine L. M. & Bosze Z., Structure of the rabbit κ -casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene*, 1996, 174, 27-34.
- Beg O. U., Von Bahr Lindstrom H., Zaidi Z. H. & Jornvall H., A camel milk whey protein rich in half cystine. Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns, and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *Eur. J. Biochem.*, 1986, 159, 195-201.
- Bevilacqua C., Ferranti P., Garro G., Veltri C., Lagonigro R., Leroux C., Pietrola E., Addeo F., Pilla F., Chianese L. & Martin P., Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α (s1)-casein variant found in the goat species. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 1293-1303.
- Blum J., Zeigler M. & Wicha M., Regulation of mammary differentiation by the extracellular matrix. *Environ Health Perspect.*, 1989, 80, 71-83.
- Boisgard R. & Chanat E., Phospholipase D-dependent and -independent mechanisms are involved in milk protein secretion

- in rabbit mammary epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1495, 281-296.
- Bouguyon E., Beauvallet C., Huet J. C. & Chanut E., Disulphide bonds in casein micelle from milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 343, 450-458.
- Brasset E. & Vauzy C., Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity*, 2005, 94, 571-576.
- Byatt J. C., Welply J. K., Leimgruber R. M. & Collier R. J., Characterization of glycosylated bovine placental lactogen and the effect of enzymatic deglycosylation on receptor binding and biological activity. *Endocrinology*, 1990, 127, 1041-1049.
- Chambeyron S., Da Silva N. R., Lawson K. A. & Bickmore W. A., Nuclear re-organisation of the *hoxb* complex during mouse embryonic development. *Development*, 2005, 132, 2215-2223.
- Chanut E., Martin P. & Ollivier-Bousquet M., α S1-casein is required for the efficient transport of β - and κ -casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 1999, 112 (Pt 19), 3399-3412.
- Chen L. & Bissell M., Transferrin mRNA level in the mouse mammary gland is regulated by pregnancy and extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 17247-17250.
- Clermont Y., Xia L., Rambourg A., Turner J. D. & Hermo L., Transport of casein submicelles and formation of secretion granules in the Golgi apparatus of epithelial cells of the lactating mammary gland of the rat. *Anat. Rec.*, 1993, 235, 363-373.
- Cremer T. & Cremer C., Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev. Genet.*, 2001, 2, 292-301.
- Daudet F., Augeron C. & Ollivier-Bousquet M., Early action of colchicine, ammonium chloride and prolactin, on secretion of milk lipids in the lactating mammary gland. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1981, 24, 197-202.
- Davies D. T., Holt C. & Christie W. W., The composition of milk. *Biochemistry of lactation*, edited by T. B. Mepham, 1983, Elsevier, 71-117.
- de Belle I., Cai S. & Kohwi-Shigematsu T., The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) *in vivo* in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *J. Cell. Biol.* 1998, 141, 335-48.
- De Kruijff C. G. & Holt C., *Casein micelle structure, functions and interactions*. In: Advanced dairy chemistry, vol. 1. 2003. (eds Fox P. F. and McSweeney P. L. H.), 233-276.
- Demmer J., Burdon T. G., Djiane J., Watson C. J. & Clark A. J., The proximal milk protein binding factor binding site is required for the prolactin responsiveness of the sheep β -lactoglobulin promoter in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995, 107, 113-121.
- Devinoy E., Malienou-N'Gassa R., Thépot D., Puissant C. & Houdebine L. M., Hormone responsive elements within the upstream sequences of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene direct Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) reporter gene expression in transfected rabbit mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1991, 81, 185-193.
- Devinoy E., Montoliu L., Baranyi M., Thépot D., Hiripi L., Fontaine M. L., Bodrogi L. & Bosze Z., Analysis of the efficiency of the rabbit whey acidic protein gene 5' flanking region in controlling the expression of homologous and heterologous linked genes. *J. Dairy Res.*, 2005, 72, 113-119.
- Dickinson L. A. & Kohwi-Shigematsu T., Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 456-465.
- Doppler W., Groner B. & Ball R., Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 104-108.
- Doppler W., Villunger A., Jennewein P., Brduscha K., Groner B. & Ball R. K., Lactogenic hormone and cell type-specific control of the whey acidic protein gene promoter in transfected mouse cells. *Mol. Endocrinol.*, 1991, 5, 1624-1632.
- Edwards M. C., Liegeois N., Horecka J., DePinho R.A., Sprague G. F. Jr, Tyers M. & Elledge S. J., Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far-phenotype on yeast cells. *Genetics*, 1997, 147, 1063-1076.
- Farah Z., Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy Res.*, 1993, 60, 603-626.
- Fourrel G., Magdinier F. & Gilson I., Insulator dynamics and the setting of chromatin domains. *Bioessays*, 2004, 26, 523-532.
- Francastel C., Magis W. & Groudine M., Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 12120-12125.
- Galang C. K., Muller W. J., Foos G., Oshima R. G. & Hauser C. A., Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 11281-11292.
- Galio L., Martin C., Hue-Beauvais C., Renou J. P., Charlier M., Péchoux C., Ollivier-Bousquet M., Gourdou I., Djiane J., Hennighausen L. & Devinoy E., Contribution of microarray approaches to study the regulation of gene expression in the mammary gland by prolactin and related hormones. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2005, 56, 244-245.
- Gass S., Harris J., Ormandy C. & Brisken C., Using gene expression arrays to elucidate transcriptional profiles underlying prolactin function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2003, 8, 269-285.
- Gerdes M. G., Carter K. C., Moen P. T. & Lawrence J. B., Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by *in situ* hybridization to nuclear halos. *J. Cell. Biol.*, 1994, 126, 289-304.
- German T. & Barash I., Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Animal*, 2002, 38, 282-292.
- Ghosal D., Shappell N. W. & Keenan T. W., Endoplasmic reticulum luminal proteins of rat mammary gland. Potential involvement in lipid droplet assembly during lactation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1200, 175-181.
- Gordon K., Binas B., Chapman R. S., Kurian K. M., Clarkson R. W., Clark A. J., Lane E. B. & Watson C. J., A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in the mouse mammary gland. *Breast Cancer Res.*, 2000, 2, 222-235.
- Gouilleux F., Wakao H., Mundt M. & Groner B., Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.*, 1994, 13, 4361-4369.
- Gupta P., Rosen J. M. & D'Eustachio P. R. F. H., Localization of the casein gene family to a single mouse chromosome. *J. Cell. Biol.*, 1982, 93, 199-204.
- Harris S., McClenaghan M., Simons J. P., Ali S. & Clark A. J., Developmental regulation of the sheep β -lactoglobulin gene in the mammary gland of transgenic mice. *Develop. Genet.*, 1991, 12, 299-307.
- Heid H. W. & Keenan T. W., Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2005, 84, 245-258.
- Heitz E., Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 1928, 69, 762-818.
- Hiripi L., Baranyi M., Szabo L., Toth S., Fontaine M. L., Devinoy E. & Bosze Z., Effect of rabbit κ -casein expression on the properties of milk from transgenic mice. *J. Dairy Res.*, 2000, 67, 541-550.
- Holt C. *Structure and stability of bovine casein micelles*. In: Adv. Protein Chem., vol. 43, 1992, (Edall J. T., Anfinsen C. B., Richards F. M. & Eisenberg D. S. eds), 63-151.

- Horne D. S., Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, 1998, 8, 171-177.
- Houdebine L. M., Devinoy E. & Delouis C., Stabilization of casein mRNA by prolactin and glucocorticoids. *Biochimie*, 1978, 60, 57-63.
- Iarovaia O. V., Bystritskiy A., Ravcheev D., Hancock R. & Razin S. V., Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 2079-2086.
- Iarovaia O. V., Akopov S. B., Nikolaev L. G., Sverdlov E. D. & Razin S. V., Induction of transcription within chromosomal DNA loops flanked by MAR elements causes an association of loop DNA with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 4157-4163.
- Ivanchenko M. & Avramova Z., Interaction of MAR-sequences with nuclear matrix proteins. *J. Cell. Biochem.*, 1992, 50, 190-200.
- Jenness R., Protein composition of milk. *Milk Proteins-Chemistry and Molecular Biology*, 1970, 1, 17-43.
- Kolb A. F., Structure and regulation of the murine γ -casein gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1579, 101-116.
- Lechner J., Welte T. & Doppler W., Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. *Immunobiology*, 1997, 198, 112-123.
- Lelievre S. A. & Bissell M. J., Communication between the cell membrane and the nucleus: role of protein compartmentalization. *J. Cell. Biochem.*, 1998; 72 (S30-S31), 250-263.
- Lesne A. & Victor J. M., Chromatin fiber functional organization: some plausible models. *Eur. Phys. J.*, 2006, 19, 279-290.
- Li S. & Rosen J. M., Glucocorticoid regulation of rat whey acidic protein gene expression involves hormone-induced alterations of chromatin structure in the distal promoter region. *Mol. Endocrinol.*, 1994, 8, 1328-1335.
- Li S. & Rosen J. M., Nuclear factor I and mammary gland factor (STAT5) play a critical role in regulating rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 2063-2070.
- Lin C. Q., Dempsey P. J., Coffey R. J. & Bissell M. J., Extracellular matrix regulates whey acidic protein gene expression by suppression of TGF- α in mouse mammary epithelial cells: studies in culture and in transgenic mice. *J. Cell. Biol.*, 1995, 129, 1115-1126.
- Londos C., Sztalryd C., Tansey J. T. & Kimmel A. R., Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie*, 2005, 87, 45-49.
- Mcknight R. A., Spencer M., Dittmer J., Brady J. N., Wall R. J. & Hennighausen L., An Ets site in the whey acidic protein gene promoter mediates transcriptional activation in the mammary gland of pregnant mice but is dispensable during lactation. *Mol. Endocrinol.*, 1995, 9, 717-724.
- McLatchie L. M., Fraser N. J., Main M. J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M. G. & Foord S. M., RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 1998, 393, 333-339.
- Marsh B. J. & Howell K. E., The mammalian Golgi-complex debates. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, 3, 789-795.
- Martin P. & Grosclaude F., Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livest. Prod. Sci.*, 1993, 35, 75-93.
- Mather I. H., A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, 203-247.
- Mather I. H. & Keenan T. W., Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1998, 3, 259-273.
- Meade H., Gates L., Lacy E. & Lonberg N., Bovine α S1-casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *BioTechnology*, 1990, 8, 443-446.
- Meier V. S. & Groner B., The nuclear factor-Yy1 participates in repression of the β -casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 128-137.
- Millot B., Montoliu L., Fontaine M. L., Mata T. & Devinoy E., Hormone induced modifications of the chromatin structure surrounding the upstream regulatory regions conserved between the mouse and rabbit WAP genes. *Biochem. J.* 2003, 372, 41-52.
- Mirkovitch J., Mirault M. E. & Laemmli U. K., Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 1984, 39, 223-232.
- Mironov A. A., Weidman P. & Luini A., Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J. Cell. Biol.*, 1997, 138, 481-484.
- Misteli T., Spatial positioning: a new dimension in genome function. *Cell*, 2004, 119, 153-156.
- Mukhopadhyay S. S., Wyszomierski S. L., Gronostajski R. M. & Rosen J. M., Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21, 6859-6869.
- Murtagh J., Martin F. & Gronostajski R. M., The nuclear factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2003, 8, 241-254.
- Nicholas K. R. & Hartmann P. E., Milk secretion in the rat-progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. *Comp. Biochem. Physiol. A-Comp. Physiol.*, 1991, 98, 535-542.
- Ogg S. L., Weldon A. K., Dobbie L., Smith A. J. & Mather I. H., Expression of butyrophilin (Btln1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 10084-10089.
- Ollivier-Bousquet M., Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2002, 42, 149-162.
- Patton S., Reversible suppression of lactation by colchicine. *FEBS Lett.*, 1974, 48, 85-87.
- Pauloin A., Rogel-Gaillard C., Piumi F., Hayes H., Fontaine M. L., Chanut E., Chardon P. & Devinoy E., Structure of the rabbit α s1- and β -casein gene cluster, assignment to chromosome 15 and expression of the α s1-casein gene in HC11 cells. *Gene*, 2002, 283, 155-162.
- Pauloin A., Ollivier-Bousquet M. & Chanut E., The double-play of PP17/TIP47. *Med. Sci. (Paris)*, 2004, 20, 1020-1025.
- Péchoix C., Boisgard R., Chanut E. & Lavielle F., Ca²⁺-independent phospholipase A2 participates in the vesicular transport of milk proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1743, 317-329.
- Pelham H. R. & Rothman J. E., The debate about transport in the Golgi-two sides of the same coin? *Cell*, 2000, 102, 713-719.
- Persuy M. A., Legrain S., Printz C., Stinnakre M. G., Lepourry L., Brignon G. & Mercier J. C., High-level, stage- and mammary-tissue-specific expression of a caprine κ -casein-encoding minigene driven by a β -casein promoter in transgenic mice. *Gene*, 1995, 165, 291-296.
- Poljak L. & Kas E., Resolving the role of topoisomerase II in chromatin structure and function. *Trends in Cell. Biol.*, 1995, 5, 348-354.
- Poussin K., Hayes H., Pauloin A., Chanut E., Fontaine M. L., Aujean E., Sun J. S., Debey P. & Devinoy E., Interactions between the rabbit Csn1 gene and the nuclear matrix of stably transfected HC11 mammary epithelial cells vary with its level of expression. *J. Cell. Biochem.*, 2005, 96, 611-621.
- Poyet P., Henning S. & Rosen J., Hormone dependent β -casein mRNA stabilization requires ongoing protein synthesis. *Mol. Endocrinol.* 1989, 3, 1961-1968.

- Puissant C., Bayat-Sarmadi M., Devinoy E. & Houdebine L. M., Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur. J. Endocrinol.*, 1994, *130*, 522-529.
- Rabouille C. & Klumperman J., Opinion: the maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, *6*, 812-817.
- Rasmussen L. K., Johnsen L. B., Tsiora A., Sorensen E. S., Thomsen J. K., Nielsen N. C., Jakobsen H. J. & Petersen T. E., Disulphide-linked caseins and casein micelles. *Int. Dairy J.*, 1999, *9*, 215-218.
- Rennison M. E., Handel S. E., Wilde C. J. & Burgoyne R. D., Investigation of the role of microtubules in protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 1992, *102* (Pt 2), 239-247.
- Renz A. & Fackelmayer F. O., Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1996, *24*, 843-849.
- Rijnkels M., Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary gland Biol. Neoplasia*, 2002, *7*, 327-345.
- Rijnkels M., Elnitski L., Miller W. & Rosen J. M., Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics*, 2003, *82*, 417-432.
- Rival S., Attal J., Delville-Giraud C., Yerle M., Laffont P., Rogel-Gaillard C. & Houdebine L. M., Cloning, transcription and chromosomal localization of the porcine whey acidic protein gene and its expression in HC11 cell line. *Gene*, 2001, *267*, 37-47.
- Rival-Gervier S., Thépot D., Jolivet G. & Houdebine L. M., Pig whey acidic protein gene is surrounded by two ubiquitously expressed genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, *1627*, 7-14.
- Rollema H. S., *Casein association and micelle formation*. In: Advanced dairy chemistry, vol. 1, 1992, (Fox P. F. eds), 11-140.
- Rosen J. M., Wyszomierski S. L. & Hadsell D., Regulation of milk protein gene expression. *Ann. Rev. Nut.*, 1999, *19*, 407-436.
- Rudolph M. C., McManaman J. L., Hunter L., Phang T. & Neville M. C., Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2003, *8*, 287-307.
- Sakakura T., New aspects of stroma parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Internat. Rev. Cytology*, 1991, *125*, 165-202.
- Schiessel H., Comment on chromatin fiber functional organization: some plausible models by A. Lesne and J. M. Victor. *Eur. Phys. J.*, 2006, *19*, 291-292.
- Schmidhauser C., Bissell M. J., Myers C. A. & Casperson G. F., Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine β -casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, *87*, 9118-9122.
- Schmidhauser C., Casperson G. F., Myers C. A., Sanzo K. T., Bolten S. & Bissell M. J., A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin and extracellular matrix-dependent regulation of β -casein gene expression. *Mol. Biol. Cell.*, 1992, *3*, 699-709.
- Schmidt D. G., *Association of caseins and casein micelle structure*. In: Developments in dairy chemistry 1-Proteins, vol. 1, 1982, (Fox P. F. eds), 61-85.
- Stocklin E., Wissler M., Gouilleux F. & Groner B., Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 1996, *383*, 726-728.
- Suchyta S. P., Sipkovsky S., Halgren R. G., Kruska R., Eftman M., Weber-Nielsen M., Vandehaar M. J., Xian L., Tempelman R. J. & Coussens P. M., Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary specific transcripts. *Physiol. Genomics*, 2004, *16*, 8-18.
- Tanabe H., Kupper K., Ishida T., Neusser M. & Mizusawa H., Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in old world monkeys. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, *108*, 255-261.
- Thépot D., Devinoy E., Fontaine M. L., Stinnakre M. G., Mas-soud M., Kann G. & Houdebine L. M., Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, *42*, 261-267.
- Trott J. F., Simpson K. J., Moyle R. L. C., Hearn C. M., Shaw G., Nicholas K. R. & Renfree M. B., Maternal regulation of milk composition, milk production, and pouch young development during lactation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Biol. Reprod.*, 2003, *68*, 929-936.
- Van Eenennaam A. L. & Medrano J. F., Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous κ -casein cows. *J. Dairy Sci.*, 1991, *74*, 1491-1496.
- Vorbach C., Scriven A. & Capecchi M. R., The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev.*, 2002, *16*, 3223-3235.
- Walstra P., On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 1990, *73*, 1965-1979.
- Walstra P., *Physical chemistry of milk fat globules*. In: Advanced dairy chemistry, vol. 2, Lipids, 1995, (Fox P. F. eds).
- Welte T., Philipp S., Cairns C., Gustafsson J.A. & Doppler W., Glucocorticoid receptor binding sites in the promoter region of milk protein genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1993, *47*, 75-81.
- Welte T., Garimorth K., Philipp S., Jennewein P., Huck C., Cato A. C. B. & Doppler W., Involvement of Ets-related proteins in hormone-independent mammary cell-specific gene expression. *Eur. J. Biochem.*, 1994, *223*, 997-1006.
- Winklehner-Jennewein P., Geymayer S., Lechner J., Welte T., Hansson L., Geley S. & Doppler W., A distal enhancer region in the human β -casein gene mediates the response to prolactin and glucocorticoid hormones. *Gene*, 1998, *217*, 127-139.
- Wu C. C., Yates J. R. 3rd, Neville M. C. & Howell K. E., Proteomic analysis of two functional states of the Golgi complex in mammary epithelial cells. *Traffic*, 2000a, *1*, 769-82.
- Wu C. C., Howell K. E., Neville M. C., Yates J. R. 3rd & McManaman J. L., Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. *Electrophoresis*, 2000b, *21*, 3470-3482.
- Wyszomierski S. L. & Rosen J. M., Cooperative effects of STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein- β) on β -casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.*, 2001, *15*, 228-240.
- Zhou J., Chehab R., Tkalcic J., Naylor M.J., Harris J., Wilson T. J., Tsao S., Tellis I., Zavarsek S., Xu D., Lapinskas E. J., Hivsvader J., Lindeman G. J., Thomas R., Ormandy C. J., Hertzog P. J., Kola I. & Pritchard M. A., Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *EMBO J.*, 2005, *24*, 635-644.
- Zlatanova J., Leuba S. H. & van Holde K., Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J.* 1998, *74*, 2554-2566.